



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C07K 16/00</b>	<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/57150</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber &amp; Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</p>

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

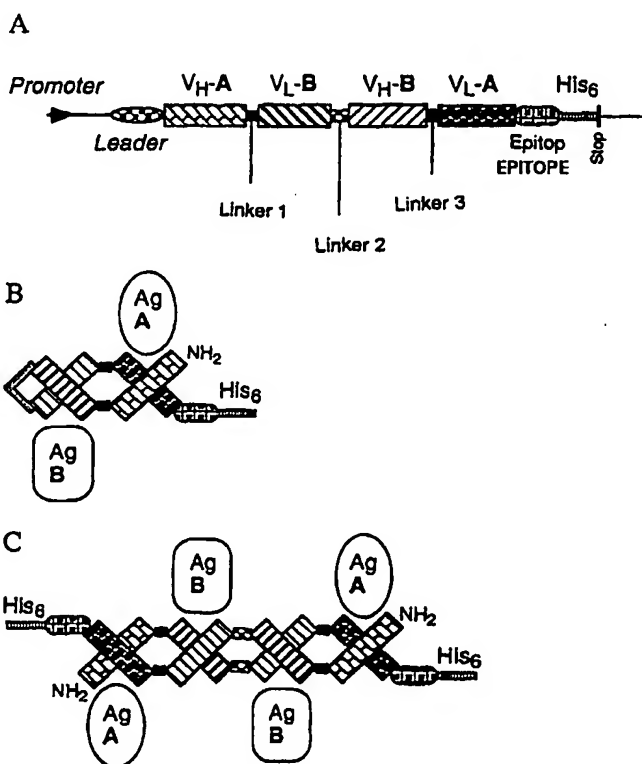
(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE

(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F<sub>v</sub> antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F<sub>v</sub> antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F<sub>v</sub> antibody constructs and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.



BEST AVAILABLE COPY

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

### Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei  $V_H$ - und zwei  $V_L$ -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer  $V_H$ - und einer  $V_L$ -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß  $F_v$ -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2

einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes,  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen  $F_v$ -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzel-

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

## 3

kettigen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem  $NH_2$ -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz  $(G_4S)_4$ , aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4

Ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 6 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " $F_v$ -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, pPIC-DISC-SL, pDISC5-LL und pDISC6-SL. Die ersteren vier wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

5

Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

### Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

**Fig. 1** zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His<sub>6</sub>: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 2** zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His<sub>6</sub>: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 3** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /*lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 4** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

6

Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 5** zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 6** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten  $F_v$ -Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 7** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des



WO 99/57150

PCT/DE99/01350

7

*Saccharomyces cerevisiae*- $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignals;  $V_H$ : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

**Fig. 8** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine  $\alpha$ -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignals;  $V_H$ : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

**Fig. 9** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC5-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Repressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das  $\alpha$ -Peptid von  $\beta$ -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ -Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem *E. coli* lacZ Gen (*lacZ*), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem *E. coli* *skp* Gen (*skp*) stammt; *skp*: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 10** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC6-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für  $\beta$ -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Re-

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

8

pressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das  $\alpha$ -Peptid von  $\beta$ -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator;  $V_H$  und  $V_L$ : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten in Bakterien**

Die Plasmide pHOG- $\alpha$ CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges  $F_v$ -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der  $V_H$ -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCA-CACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und mit dem mit *EcoRI/EcoRV* linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der  $V_L$ -Domäne von Anti-CD19,

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

9

gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACA-CAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCA-CACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-T A C T G C A G C T G C A C C T G G C T A C C A C C A C - CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCACCACCACC-AGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Ncd*/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Ncd*/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

**Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Hefe**

**(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL**

Der Vektor pPICZaA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevi-*

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

10

*siae*  $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, Zeocin<sup>TM</sup>, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAAT-TCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBn 5'-GGTC-GACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *XbaI* gespalten und in mit *EcoRI/XbaI* linearisiertes pPICZ $\alpha$ A ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

#### (B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZ $\alpha$ A wurde mit *EcoRI* gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *XbaI* gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *NcoI* gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *XbaI* wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

#### Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

*E. coli*/XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

11

über Nacht in 2xYT-Medium mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT<sub>GA</sub>) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT<sub>GA</sub> wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu<sup>2+</sup> beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976,

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

12

*Anal. Biochem.*, 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A<sub>280</sub>-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten  $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1,96$  bzw. 1,93 bestimmt.

**Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris***

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *SacI* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin<sup>TM</sup> enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-*myc*-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

**Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes**

**(A) Größenausschlußchromatographie**

Eine analytische Gelfiltration der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

13

Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200  $\mu$ l/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

#### (B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>-akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 x 10<sup>5</sup> Zellen in 50  $\mu$ l RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100  $\mu$ l der F<sub>v</sub>-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l 10  $\mu$ g/ml anti-c-*myo*-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100  $\mu$ l 1  $\mu$ g/ml Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

#### (C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [<sup>51</sup>Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 x 10<sup>6</sup> Zielzellen wurden mit 200  $\mu$ Ci

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

14

$\text{Na}[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$  (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von  $2 \times 10^5/\text{ml}$  resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6/\text{ml}$  eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in  $100 \mu\text{l}$  wurden auf  $10^4$  Zielzellen/Vertiefung in  $50 \mu\text{l}$  titriert.  $50 \mu\text{l}$  Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.  $100 \mu\text{l}$  des Überstands wurden gewonnen und auf  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als:  $(\text{experimentelle Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) / (\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung}) \times 100$ .

**Beispiel 6: Konstruktion der Plasmide pDISC5-LL und pDISC6-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen  $F_v$ -Antikörper-Konstrukten in Bakterien durch Hoch-Zelldichte-Fermentation**

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, die das *hok/sok* Plasmid-freie Zell-"suicide"-System und ein Gen enthielten, das für den *Skp/OmpH* periplasmatischen Faktor für eine größere Herstellung rekombinanter Antikörper kodiert. Das *skp* Gen wurde durch PCR mittels der Primer *skp-1*, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G und *skp-2*, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G unter Verwendung des Plasmids pGAH317 (Holck and Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit *AflIII* und *HindIII* gespalten und in das mit *AflIII*/*HindIII* linearisierte Plasmid pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) inseriert, wodurch der Vektor pSKK erhalten wurde. Die in

5 den Plasmiden pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL enthaltenen und für die scFv-Antikörper-Konstrukte kodierenden Gene wurden durch PCR mittels der Primer fe-



WO 99/57150

PCT/DE99/01350

15

- 1, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC und fe-  
2, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G  
amplifiziert. Die XbaI/AflII gespaltenen PCR-Fragmente wurden in pSKK vor dem  
skp Insert inseriert, wodurch die Expressionsplasmide pDISC5-LL bzw. pDISC6-SL  
5 erhalten wurden, die tri-cistronische Operons unter der Kontrolle des lac  
Promotor/Operator-Systems enthalten (vgl. Fig. 9, 10).

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

16

K 2675

**Patentansprüche**

- 5        1.    Multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
- 10       2.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 - 10 Aminosäuren aufweisen.
- 15       3.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
- 15       4.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
- 20       5.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.
- 20       6.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> aufweist.
- 25       7.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
- 25       8.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.
- 30       9.    F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

17

10. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
- 5 11. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem  
15 Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
- 20 15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.  
25 18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC5-LL.
- 30 20. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC6-SL.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

18

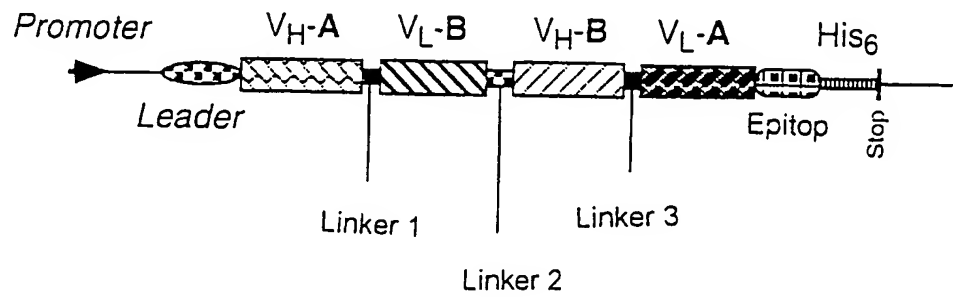
21. Verwendung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
  22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.
- 5

WO 99/57150

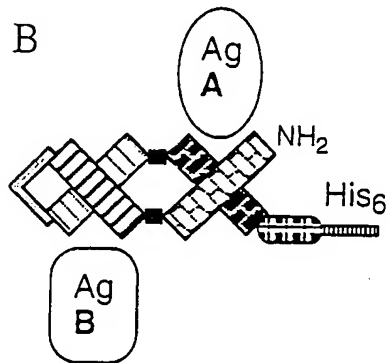
PCT/DE99/01350

1/10

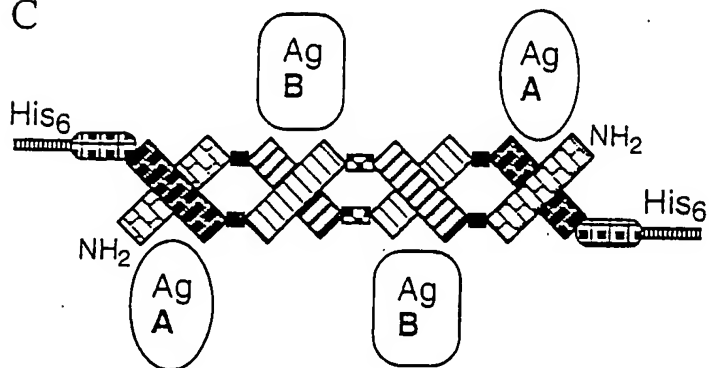
A



B



C

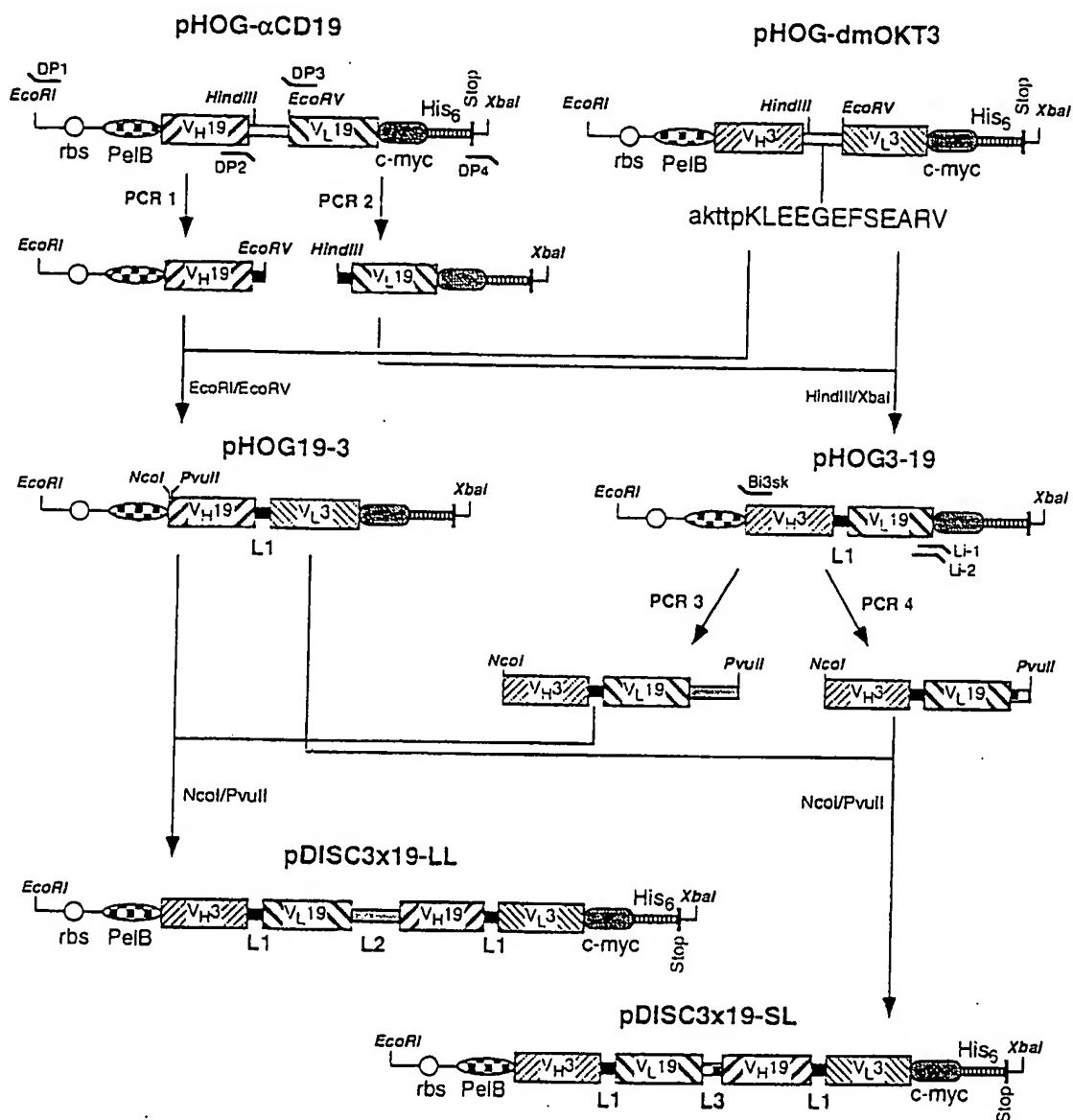


FIGUR 1

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2/10



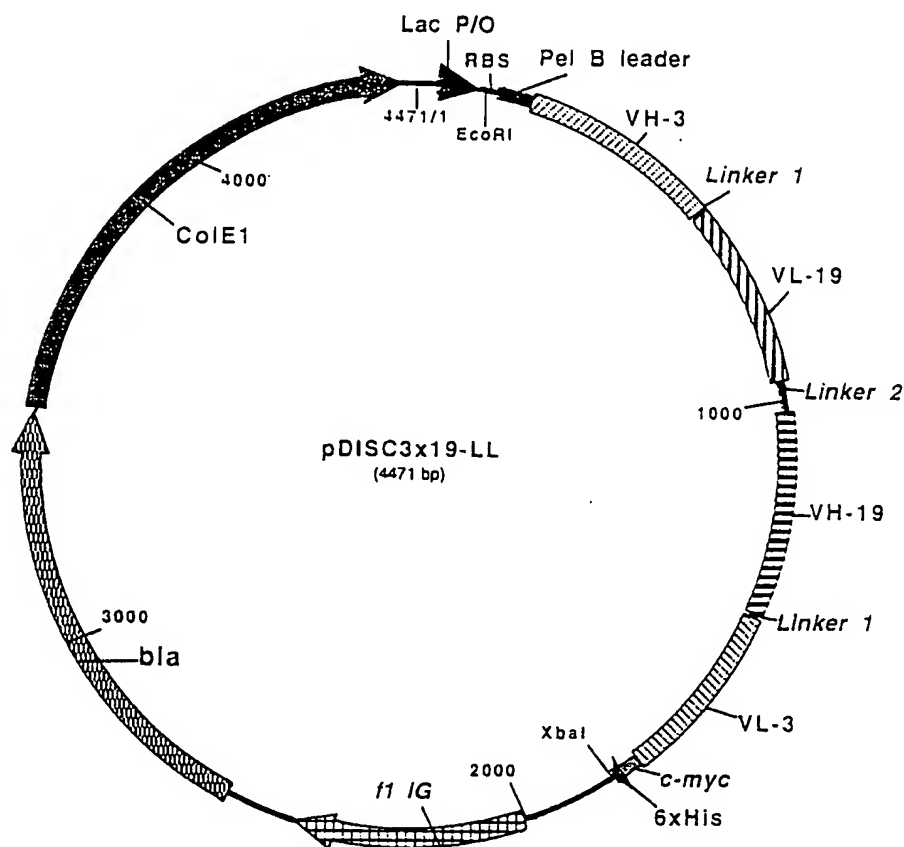
Linkers: L1 = GG  
 L2 = (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>  
 L3 = GGPGS

FIGUR 2

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

3/10

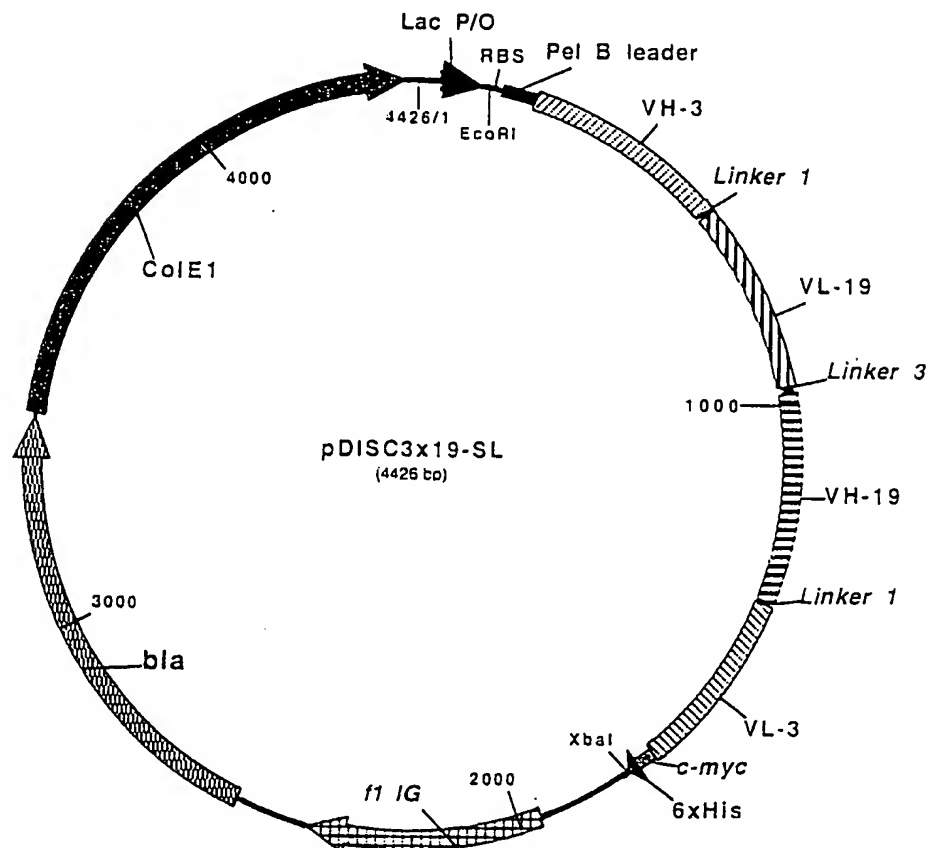


FIGUR 3

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4/10



FIGUR 4



WO 99/57150

5/10

PCT/DE99/01350

EcoRI RBS PstI leader NcoI

1 GAATTCATTAAGGCGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCTTACGGCCAGCGCGCTGGCTTGGCTGCTGCTGCGAGCTCAGCGCGCCATCG

120 M N Y L P T A A A S L L L L A A Q P A M

Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCACTGCGAGCAGTCTGGGGCTGAACCTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGCGCTTCTGGCTACACCTTTAC

22 A Q V Q L Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G V T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGGCACTGGGTAAACAGAGCGCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGCTGGTTATAC

52 R Y T M H N V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGCGCTCATTGACTACAGACAATCTCCAGCACAGCGTACATGCACTGAGCGCGCTGAC

30 N Y N Q K F K C K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

154 ATCTGAGGACTCTGCGAGTCTATTACTCTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCGCTTGACTACTGGCGCCAGGCGACCTCTCA

109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCTCAGCTGAGGCGAGCTGGCGGTGATATCTTCTCAGCGCAACTCCAGCGCTTCTGGCTGTCTCTTGGCGGAG

138 T V S S A K T T F K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAAGTGTGATTATGATGGGTGATAGTTATTTGAACCTGATACCAACAGATTCCAGGAC

152 R A T I S C K A S C S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCTCTCTCTATGATGATCCAACTAGTTCTGGGATCCCGCCAGCTTCTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT

196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G C P P R F S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCTCAGCATCTCTCTCTGAGAGGTGGATCTGCACTATCACTGTGAGCAAAAGTACTGAGGATCTCTGGAGCTTCTGGTGA

225 T L N I H P V E X V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 2

790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAAGCGGTGCTGGCGCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGG

255 G T K L E I Y R A D A A A G G G G G S G G G G S G G G G

PvuII Frame-H1 VH anti-CD19

874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCGCGGTGCGCTGCGAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCGCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTGCAAGG

283 S G G G G S Q 7 Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

962 CTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGGATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCGCTGAGTGGATTGGACAGATTGGC

312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W

PstI Frame-H3

1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCTCGCGACGCTAC

341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y

CDR-H3

1133 TGCACTCAGCAGCGCTAGCATCTGAGGACTCTGGGCTATTTCTGTGCAACAGCGGGAGACTACGACGGTAGGCGGTTATTACTAT

369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y

Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1

1219 GCTATGGACTACTGGGCTCAGGACCTCAGTCACTCTCTCTCAGCGCAAGCAGCGGAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACTC

398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T

VL anti-CD3 CDR-L1

1307 AGTCTCAGCAATCATGTCTGCACTCTGAGGAGAGGTCACCATGACCTGCACTGCGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAAGTGG

427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W

Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3

1393 TACCAGCAGAGTCAAGGCACTCTGGGCAAGATGGATTATGACACATCCAACTGGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGCA

456 Y Q Q K S G T S P E R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G

CDR-L3

1481 GTGGCTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAGCATCAGCGGCTGAGGCTGAAGATGCTGCGACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA

485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N

Frame-L4 C kappa c-myc epitope

1569 CCCATTACAGTCTGGGCTGGGCAAGTTGGAAATAAACCGGCTGATCTGCACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAG

514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S

His6 tail XbaI

1655 AAGAAGCCTAAACTCAGTCTGCGATCTGCTAATCTAGA

543 E E D L N S H H H H H H

FIGUR 5

**6/10**

[illegible]

FIGUR 6

WO 99/57150

7/10

PCT/DE99/01350

941 ATGAGATTTCCCTTCAATTTTTTACTGCTGTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCCGATG  
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT  
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGCGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTGCAACTGCAGCAGTC  
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

8/10

941 ATGAGATTTCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC  
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG  
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCT  
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAACAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG  
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

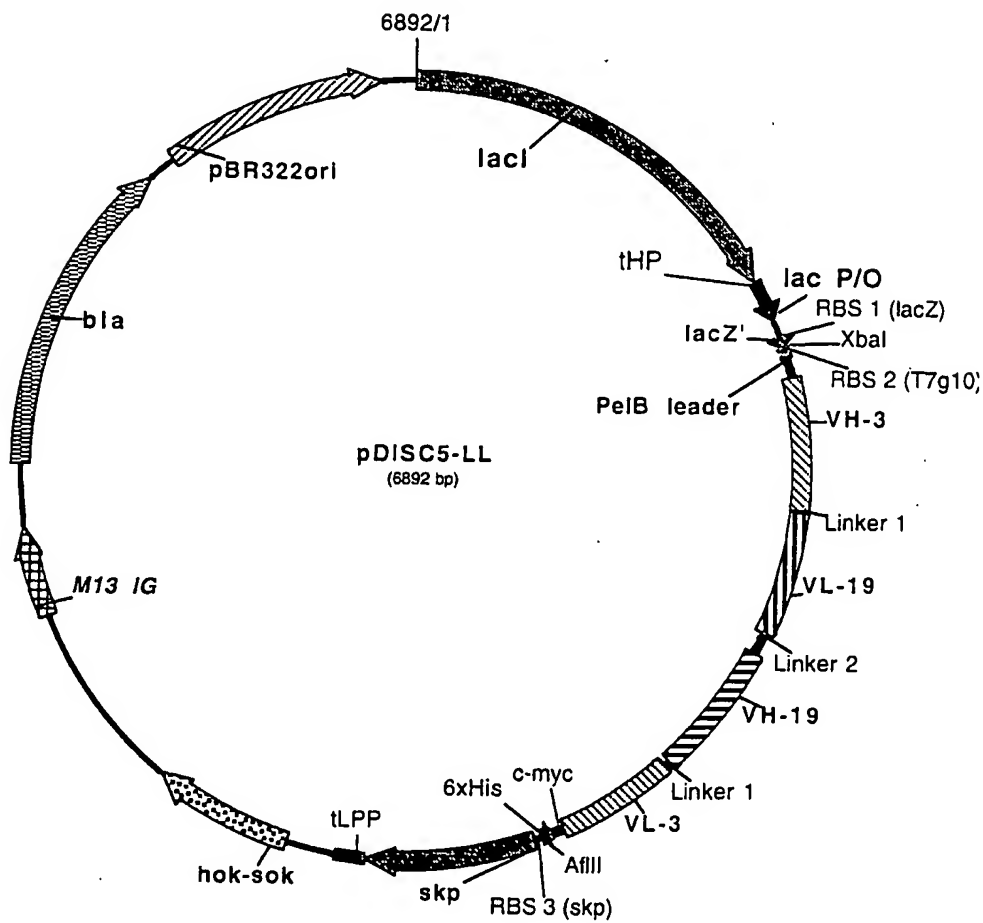
1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT  
99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

9/10

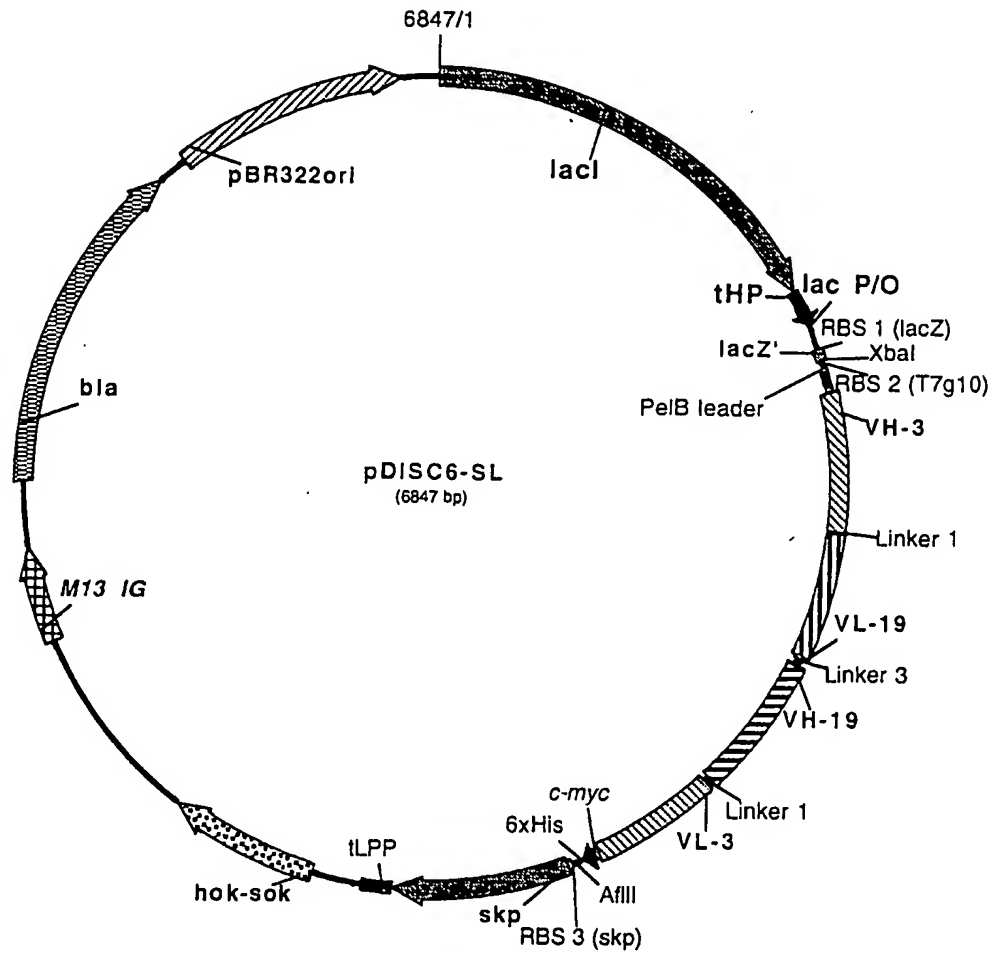


FIGUR 9

WO 99/57150

10/10

PCT/DE99/01350



FIGUR 10

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

1

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Multivalente Antikörper-Konstrukte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 28..1689

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LÄNGE: 28..1689

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA  
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala  
1 5

51

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2

GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val 10 15 20	99
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val 25 30 35 40	147
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met 45 50 55	195
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr 60 65 70	243
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp 75 80 85	291
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 90 95 100	339
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 105 110 115 120	387
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr 125 130 135	435
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 140 145 150	483
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg 155 160 165	531
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp 170 175 180	579
AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 185 190 195 200	627
CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe 205 210 215	675
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val 220 225 230	723



WO 99/57150

PCT/DE99/01350

3

GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp 235 240 245	771
CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp 250 255 260	819
GCT GCG GCC GCT GGT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGT GGT AGC GGT GGT Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly 265 270 275 280	867
GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGT AGC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly 285 290 295	915
GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala 300 305 310	963
TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg 315 320 325	1011
CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT GGT Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly 330 335 340	1059
GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT GCA Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 345 350 355 360	1107
GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA TCT Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser 365 370 375	1155
GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG GTA Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Val 380 385 390	1203
GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val 395 400 405	1251
ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC GTG Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val 410 415 420	1299
CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val 425 430 435 440	1347
ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG TAC Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr 445 450 455	1395

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4

CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser 460 465 470	1443
AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT GGG Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly 475 480 485	1491
ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala 490 495 500	1539
ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser 505 510 515 520	1587
GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA TCC Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser 525 530 535	1635
GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT CAC Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His 540 545 550	1683
CAT CAC TAATCTAGA His His	1698

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 554 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu 20 25 30
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly 35 40 45
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly 50 55 60
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr 65 70 75 80

**PCT/DE99/01350**

Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	
				85					90					95		
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	
				100					105					110		
Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Ser	Leu	
				115					120					125		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	
				130					135					140		
Thr	Pro	Lys	Leu	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala	Ser	
				145					150					155		
Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
				165					170					175		
Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	
				180					185					190		
Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	
				195					200					205		
Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
				210					215					220		
Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
				225					230					235		
His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	
				245					250					255		
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	
				260					265					270		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
				275					280					285		
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	
				290					295					300		
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				305					310					315		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
				325					330					335		
Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	
				340					345					350		
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
				355					360					365		

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

6

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 370 375 380

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp  
 385 390 395 400

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr  
 405 410 415

Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 420 425 430

Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 435 440 445

Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro  
 450 455 460

Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala  
 465 470 475 480

His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 485 490 495

Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser  
 500 505 510

Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg  
 515 520 525

Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
 530 535 540

Asp Leu Asn Ser His His His His His His  
 545 550

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1653 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄNGE: 28..1644

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

7

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide

(B) LAGE:28..1644

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA	51
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala	
1 5	
GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG	99
Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val	
10 15 20	
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG	147
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val	
25 30 35 40	
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG	195
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met	
45 50 55	
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC	243
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	
60 65 70	
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC	291
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp	
75 80 85	
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA	339
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln	
90 95 100	
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA	387
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
105 110 115 120	
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT	435
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
125 130 135	
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC	483
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile	
140 145 150	
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG	531
Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	
155 160 165	
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT	579
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp	
170 175 180	

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

8

AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 185 190 195 200	627
CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe 205 210 215	675
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val 220 225 230	723
GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp 235 240 245	771
CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp 250 255 260	819
GCT GCG GCC GCT GGT GGC CCA GGG TCG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser 265 270 275 280	867
GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys 285 290 295	915
GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln 300 305 310	963
AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp 315 320 325	1011
GGT GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr 330 335 340	1059
GCA GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala 345 350 355 360	1107
TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr 365 370 375	1155
GTA GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser 380 385 390	1203
GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 395 400 405	1251

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

9

GTG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG	1299
Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys	
410 415 420	
GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG	1347
Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp	
425 430 435 440	
TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA	1395
Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr	
445 450 455	
TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT	1443
Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser	
460 465 470	
GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT	1491
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala	
475 480 485	
GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC	1539
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly	
490 495 500	
TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA	1587
Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly	
505 510 515 520	
TCC GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT	1635
Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His	
525 530 535	
CAC CAT CAC TAATCTAGA	1653
His His His	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 539 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
20 25 30
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

10

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
 50 55 60  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr  
 65 70 75 80  
 Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys  
 85 90 95  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 100 105 110  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu  
 115 120 125  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
 130 135 140  
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 165 170 175  
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln  
 180 185 190  
 Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu  
 195 200 205  
 Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 210 215 220  
 Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr  
 225 230 235 240  
 His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 245 250 255  
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly  
 260 265 270  
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly  
 275 280 285  
 Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser  
 290 295 300  
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys  
 325 330 335



WO 99/57150

PCT/DE99/01350

11

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala  
                   340                                  345                                  350  
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe  
                   355                                  360                                  365  
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met  
                   370                                  375                                  380  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr  
                   385                                  390                                  395                                  400  
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile  
                                   405                                  410                                  415  
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
                                   420                                  425                                  430  
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
                   435                                  440                                  445  
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
                   450                                  455                                  460  
 Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
                   465                                  470                                  475                                  480  
 Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp  
                                   485                                  490                                  495  
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
                                   500                                  505                                  510  
 Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
                   515                                  520                                  525  
 Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His  
                   530                                  535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCCG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGTGAATTC CAGGTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 348 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

13

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..348

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide

(B) LAGE:1..348

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG GTG CAA CTG CAG	288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln	
85 90 95	
CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC	336
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser	
100 105 110	
TGC AAG GCT TCT	348
Cys Lys Ala Ser	
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

14

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser  
1 5 10 15  
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln  
20 25 30  
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe  
35 40 45  
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
50 55 60  
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
65 70 75 80  
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln  
85 90 95  
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser  
100 105 110  
Cys Lys Ala Ser  
115

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (iv) ANTISENSE: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..354

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE: 1..354

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC ATG GCG CAG GTG CAA	288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln	
85 90 95	
CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG	336
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys	
100 105 110	
ATG TCC TGC AAG GCT TCT	354
Met Ser Cys Lys Ala Ser	
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 118 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

16

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu  
     50                    55                    60  
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val  
     65                    70                    75                    80  
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln  
                     85                    90                    95  
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys  
             100                    105                    110  
 Met Ser Cys Lys Ala Ser  
     115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTAA CC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

17

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTGGC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAACT CCA

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

18

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC  
GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG

60

102



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**